

Marta Kmet

**Povezanost stresa
i aktivacije koagulacijskog sustava**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre Milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr.sc. Nade Vrkić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na pristupačnosti, uloženom trudu i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima i Renati na bezuvjetnoj podršci tijekom studiranja.

Zahvaljujem svojim prijateljima što su mi uljepšali i ispunili ove godine provedene u Zagrebu.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Stres	1
1.1.1. Akutni stres	2
1.1.2. Kronični stres	2
1.1.3. Stres na poslu	3
1.1.4. Povezanost stresa i kardiovaskularnih oboljenja.....	4
1.2. Sustav hemostaze.....	5
1.2.1. Komponente hemostaze	5
1.2.2. Koagulacijske pretrage	9
1.3. Laboratorijski pokazatelji stresa.....	11
1.3.1. Biokemijski pokazatelji stresa.....	11
1.3.2. Koagulacijski pokazatelji stresa	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Ispitanici	15
3.2. Uzorkovanje.....	15
3.3. Priprema uzorka.....	15
3.4. Automatizirane metode.....	16
3.4.1. Kalibracija i kontrola kvalitete	16
3.4.2. Određivanje PV-a	16
3.4.3. Određivanje APTV-a.....	17
3.4.4. Određivanje fibrinogena.....	18
3.4.5. Određivanje TV-a.....	18
3.5. Neautomatizirana metoda: euglobulinski test.....	19
3.5.1. Reagensi	19
3.5.2. Načelo i postupak	19

3.6.	Statističke metode.....	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1.	Deskriptivna statistika rezultata mjerenja.....	21
4.2.	Usporedba rezultata s obzirom na vrijeme uzorkovanja	23
4.3.	Ispitivanje korelacije.....	25
4.4.	Rasprava	26
5.	ZAKLJUČCI	31
6.	LITERATURA.....	32
7.	SAŽETAK / SUMMARY	35
7.1.	Sažetak.....	35
7.2.	Summary.....	36
8.	PRILOZI.....	37
8.1.	Popis kratica	37

Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. UVOD

1.1. STRES

Svatko se od nas povremeno nađe u nekoj stresnoj situaciji te su nam dobro poznati neki osnovni simptomi stresa, kao što su pojačano znojenje ili ubrzani srčani ritam. O stresu se puno govori u svakodnevnom životu, najčešće u negativnom kontekstu, kao o nečemu što trebamo izbjegavati ili protiv čega se trebamo boriti. No, kratkoročno, stres može biti koristan obrambeni mehanizam koji u prirodi jedinkama omogućuje preživljavanje.

Pojam stresa može se definirati na različite načine. Možemo reći da je stres proces u kojem neki stresor, odnosno nešto što percipiramo kao opasnost, pokreće određeni psiho-biološki odgovor koji jedinki pomaže u upravljanju situacijom (McVicar i sur., 2014). U stanju stresa remeti se unutrašnja ravnoteža organizma, zbog čega je potrebno uložiti dodatne napore kako bi se on prilagodio. U kojoj će mjeri, i hoće li uopće, neki stresor izazvati stres ovisi o subjektivnom značenju tog podražaja za pojedinca. To znači da će različite osobe različito reagirati u nekoj stresnoj situaciji (Havelka, 1995). Dakle, osim o stresoru, reakcija pojedinca na stres ovisi i o njegovoj individualnoj osjetljivosti, koja je određena osobnošću, dobi i stilom života, te vanjskim okolnostima poput obitelji, prijatelja i radne atmosfere (Knežević i sur., 2009).

Psihološka komponenta odgovora na stres pojačava svjesnost, potiče bržu kogniciju i reflekske. Biološka komponenta se sastoji iz aktivacije simpatikusa, koji priprema organizam na neposrednu fizičku aktivnost, te od lučenja kortizola, koji je odgovoran za metaboličku stimulaciju i imunosne promjene (McVicar i sur., 2014).

Stresna reakcija započinje impulsima koji kreću iz korteksa, prolaze kroz limbički sustav do hipotalamusa. U hipotalamusu se stvara kortikotropin-otpuštajući hormon (CRH) koji preko portalne cirkulacije dolazi do hipofize koju stimulira na lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH). ACTH potiče koru nadbubrežne žlijezde na sintezu i lučenje glukokortikoida. Ti glukokortikoidi zatim inhibiraju aktivnost osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda mehanizmom negativne povratne sprege tako da se vežu na receptore u hipofizi, hipotalamusu i srednjem prefrontalnom korteksu uzrokujući smanjenje sekrecije CRH, a time i otpuštanje ACTH (Gu i sur., 2012). Hipotalamus je i ishodište vlakana autonomnog živčanog sustava. Za vrijeme stresa dolazi do aktivacije simpatikusa što dovodi do lučenja adrenalina i noradrenalina iz srži nadbubrežne žlijezde te do živčane stimulacije unutarnjih organa (Havelka, 1995).

Reakcije na stres mogu biti psihološke, ponašajne i fiziološke. Psihološke reakcije na stres uključuju porast tjeskobe, negativne emocije, probleme u koncentraciji, depresiju, sindrom izgaranja (eng. *burnout syndrome*) ili porast samoubojstava. Primjeri ponašajnih reakcija na stres su povlačenje i izolacija na poslu ili kod kuće, razdražljivost ili pak veća konzumacija cigareta, alkohola ili kave. Fiziološke reakcije na stres su povišenje krvnog tlaka, palpitacije, bolovi u prsima, nesanica, pojava nekih vrsta karcinoma, probavne smetnje, glavobolje, koštano-mišićne tegobe te oslabljeni imunitet (Knežević i sur., 2009).

1.1.1. Akutni stres

Akutni stres je stres koji traje u periodu od nekoliko minuta do nekoliko sati, a takav stresni odgovor ima pozitivne učinke za organizam. Naime, on ga priprema na borbu ili bijeg, djelujući na kardiovaskularni, mišićnoskeletni i neuroendokrini sustav. Pretpostavlja se da akutni stres djeluje na imunološki sustav tako da ga priprema na izazove poput ranjavanja ili infekcija koje mogu nastati u reakciji na stresor (Dhabhar, 2009).

Zbog otpuštanja katekolamina dolazi do povećanja minutnog volumena srca, povećanog protoka krvi kroz mišiće, retencije natrija, smanjenog motiliteta probavnog sustava i kutane vazokonstrikcije, povećava se koncentracija glukoze u krvi te se dilatiraju bronhiole (Ranabir i Reetu, 2011).

Puno duži učinak imaju kortikosteroidi. Mineralokortikoidi, poput aldosterona, reguliraju reapsorpciju vode i natrija, te aktivnu sekreciju kalija u bubrezima, čime se povećava krvni tlak i volumen krvi. Glukokortikoidi, u koje spada kortizol, potiču metabolizam masti i proteina i sintezu glukoze. Kortizol regulira mnoštvo kardiovaskularnih, metaboličkih, imunoloških i homeostatskih funkcija (Lee i sur., 2015).

1.1.2. Kronični stres

Kronični se stres javlja kada između stresnih podražaja ne postoji potrebno razdoblje oporavka, već se stresni događaji nižu jedan za drugim. Takvo stanje dovodi do pojačanog lučenja kortikosteroida, hipertrofije kore nadbubrežne žlijezde te atrofije timusa i drugih limfatičkih struktura (Knežević i sur., 2009).

Mehanizam negativne povratne sprege ovisan o glukokortikoidima prestaje funkcionirati jer glukokortikoidni receptori razvijaju rezistenciju. Razine molekula medijatora

stresa u organizmu ostaju visoke, čime se kompromitira imunosni sustav te se dugoročno oštećuju organi i tkiva. Naime, u kroničnom se stresu uspostavlja stanje blage, tinjajuće upale koja može biti pokretač različitih bolesti, kao što su kardiovaskularni poremećaji, dijabetes, rak, autoimuni sindromi i mentalna oboljenja kao što su depresija i anksioznost (Mariotti, 2015).

1.1.3. Stres na poslu

Stres na poslu definira se kao neravnoteža između zahtjeva i sposobnosti da se tom zahtjevu udovolji, a javlja se u situaciji kada bi, po prosudbi radnika, neuspjeh u zadovoljavanju zahtjeva imao značajne posljedice. Umjereni stres može djelovati motivirajuće, no prevelika količina stresa dovodi do niskog radnog učinka (Knežević i sur., 2009).

Kada se broj izvora stresa povećava, zaposlenicima je sve teže nositi se s njima što dovodi do lošijih rezultata rada i sindroma izgaranja na poslu (Strapajević, 2015). To je stanje emocionalnog i psihičkog iscrpljenja na poslu uzrokovano nerazmjerno visokim trudom, u vidu uloženog vremena, emocionalnog angažmana i empatije, i niskom razinom zadovoljstva u kombinaciji sa stresnim uvjetima na radnom mjestu (Varjačić i sur., 2013). Taj se sindrom javlja kod ljudi koji obavljaju zahtjevne poslove i poslove koji uključuju brigu za druge, kao što su socijalni radnici, nastavnici i zdravstveni radnici. Zdravstveni radnici, posebice liječnici, izloženi su visokim razinama stresa. Istraživanje provedeno na 500 liječnika iz Ujedinjenog Kraljevstva pokazalo je da barem jedna trećina njih ima neke karakteristike izgaranja na poslu. To uključuje emocionalnu iscrpljenost, depersonalizaciju koja dovodi do indiferentnosti zdravstvenog djelatnika prema pacijentu te neefikasnost i nezadovoljstvo vlastitim postignućima (Romani i Ashkar, 2014).

U istraživanju provedenom 2004. godine u Irskoj 56% liječnika svoj je posao ocijenilo kao izrazito stresan, a nezadovoljstvo na radu navelo je 79% liječnika. Najčešći navedeni stresori bili su hitna stanja, dežurstva, donošenje odluka nakon noćnog dežurstva, rutinski medicinski rad i mala mogućnost napredovanja (Strapajević, 2015).

Noćni rad i rad u smjenama interferiraju s društvenim životom radnika, oni su češće emocionalno iscrpljeni, nezadovoljni te iskazuju više znakova izgaranja na poslu. Snažan utjecaj na psihičko i fizičko zdravlje ima narušavanje cirkadijarnih ritmova, bioloških endogenih ritmova koji kontroliraju budnost, temperaturu tijela, krvni tlak, vrijeme reakcije

itd. To dovodi do jakog umora i smanjene funkcionalne sposobnosti različitih tjelesnih sustava (Ptičar, 2013).

U epidemiološkim studijama pronađena je poveznica između stresa na poslu i kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti, i to tako da stresan i zahtjevan posao udvostručuje rizik od smrti uzrokovane tim bolestima. Posljedice kumulativne izloženosti takvom poslu nisu do kraja poznate, no zna se da uključuju autonomnu disfunkciju i neuroendokrinu aktivaciju. Također, postoje dokazi da rad u smjenama povećava rizik od koronarne bolesti srca te da čak i kod kratkih epizoda mentalnog stresa dolazi do tranzitorne disfunkcije endotela i aktivacije koagulacije kod zdravih pojedinaca (Matejovic i sur., 2011).

1.1.4. Povezanost stresa i kardiovaskularnih oboljenja

Kardiovaskularne bolesti (KVB) su bolesti srca i krvožilnog sustava za čiji je nastanak najčešće odgovorna ateroskleroza. One su vodeći uzrok smrti u suvremenom svijetu, sa značajnim udjelom u prijevremenom umiranju, morbiditetu i dizabilitetu stanovništva. U Hrvatskoj su 2010. godine bile vodeći uzrok smrti s udjelom od 49,2% (Kralj, 2011). Aterosklerotične krvne žile karakterizirane su disfunkcijom endotela sa smanjenom proizvodnjom dušikovog oksida, čime se smanjuju antikoagulantna i profibrinolitička svojstva endotelinih stanica (von Känel, 2015).

Intenzivni mentalni stres može biti okidač ishemije ili infarkta miokarda, ventrikularne aritmije i iznenadne srčane smrti kod pacijenata s prethodnim oštećenjem krvnih žila aterosklerozom. Glavni mehanizam koji povezuje psihički stres i KVB je brzo povećanje arterijskog tlaka i srčanog ritma zbog povećane aktivnosti simpatikusa u kombinaciji s disfunkcijom endotela i aterotrombotskom aktivacijom. Kod kroničnog psihosocijalnog stresa, koji uzrokuju primjerice obiteljski problemi ili nezaposlenost, mozak pokreće obrambene mehanizme iako ne postoji stvarna ozljeda tkiva, a KVB se pojavljuju kao posljedica toga. Takav stres dovodi do kognitivnih i emocionalnih promjena koje pokreću molekularne kaskade koje rezultiraju otpuštanjem glukokortikoida i katekolamina (Vale, 2005).

U istraživanju koje se bavilo utjecajem stresa na poslu na različite metaboličke i hemostatske rizične čimbenike pokazano je da zaposlenici pod visokim stresom na radnom mjestu imaju oslabljenu fibrinolizu. To su potvrdili visoki PAI-1 i niska t-PA aktivnost, što zajedno doprinosi formaciji ugruška (Vrijkotte i sur., 1999).

1.2. SUSTAV HEMOSTAZE

Hemostaza je odgovor organizma na ozljedu krvne žile i krvarenje u kojem sudjeluju stijenke krvnih žila, trombociti i faktori zgrušavanja (Labar, 2007). Time se omogućava cijeljenje oštećenih krvnih žila, krv se održava u tekućem obliku i uklanjaju se krvni ugrušci nakon uspostavljanja vaskularnog integriteta (Versteeg i sur., 2013).

Kod ozljede krvne žile dolazi do vazokonstrikcije malih arterija i arteriola, čime se usporava protok krvi u području ozljede što smanjuje krvarenje, ali i omogućava kontaktna aktivacija trombocita i faktora zgrušavanja. Trombociti oslobađaju sadržaj svojih granula i agregiraju na mjestu ozljede, stvarajući primarni ugrušak koji se dodatno stabilizira fibrinom nastalim pomoću sustava zgrušavanja. Ubrzo započinje i proces uklanjanja neželjenih depozita fibrina enzimskim cijepanjem, čime nastaju topljivi fibrinski fragmenti (Labar, 2007).

Često se koriste i pojmovi primarne i sekundarne hemostaze, pri čemu su glavni sudionici primarne hemostaze krvne žile i trombociti, dok sekundarna hemostaza obuhvaća faktore zgrušavanja čija aktivacija dovodi do stvaranja fibrina. Treću fazu hemostaze čini fibrinoliza. Iako se pojmovi hemostaza i koagulacija često koriste kao sinonimi, bitno je naglasiti da je koagulacija samo jedan dio hemostaze (Lutze, 2000).

1.2.1. Komponente hemostaze

1.2.1.1. *Vaskularni sustav*

Ranije spomenuta vazokonstrikcija nije jedina uloga vaskularnog sustava u hemostazi. Naime, taj je sustav ključan u prokoagulantnoj i antikoagulantnoj regulaciji funkcije trombocita i faktora zgrušavanja. Endotel izlučuje von Willebrandov faktor, na njegovoj se površini odvija vezanje trombina na trombomodulin, aktivacija proteina C i uklanjanje faktora zgrušavanja pomoću antitrombina. Također, endotel doprinosi aktivaciji i regulaciji fibrinolize izlučivanjem tkivnog aktivatora plazminogena. U vaskularnom glatkom mišićju i pericitima koji okružuju žile nalazi se tkivni faktor koji sudjeluje u koagulacijskoj kaskadi (Burtis i sur., 2012).

1.2.1.2. Trombociti

Trombociti nastaju u koštanoj srži procesom megakariocitopoeze, odnosno diferencijacijom nezrelih hematopoetskih stanica u megakariocyte te fragmentacijom citoplazme zrelih megakariocita. Jedan megakariocit stvara 2000 do 3000 trombocita, normalno ih ima $250 \cdot 10^9/L$ te u perifernoj krvi žive 9 do 11 dana. Diskoidnog su oblika, bez jezgre, endoplazmatskog retikuluma ili Golgijevog aparata, a na njihovoj se površini nalaze brojni glikoproteini koji su bitni za njihovu adheziju i agregaciju (Labar, 2007).

Endotelne stanice održavaju trombocite u diskoidnom obliku izlučivanjem tvari koje ih inhibiraju, kao što su prostaglandin I_2 i NO, ali i metaboliziranjem trombocitnih agonista kao što su ADP i trombin (Chapin i Hajjar, 2015). Nakon oštećenja krvne žile, trombociti dolaze u doticaj s bazalnom membranom i kolagenom te adheriraju za subendotel vezanjem za von Willebrandov faktor na njegovoj površini, no u tom procesu sudjeluju i brojni drugi adhezijski proteini. Adhezija izaziva aktivaciju trombocita, odnosno promjenu njihovog oblika, oslobađanje granula i njihovu međusobnu agregaciju (Labar, 2007). Alfa granule sadrže proteine kao što su fibrinogen ili von Willebrandov faktor, dok guste granule sadrže neproteinske komponente kao što su adrenalin, serotonin i ADP. Također, na njihovo se površini nalaze makronuklearni kompleksi uključeni u koagulacijsku kaskadu. Trombociti sudjeluju i u retrakciji ugruška pomoću kontraktilnih proteina i time sužavaju ranu (Burtis i sur., 2012).

1.2.1.3. Sustav zgrušavanja

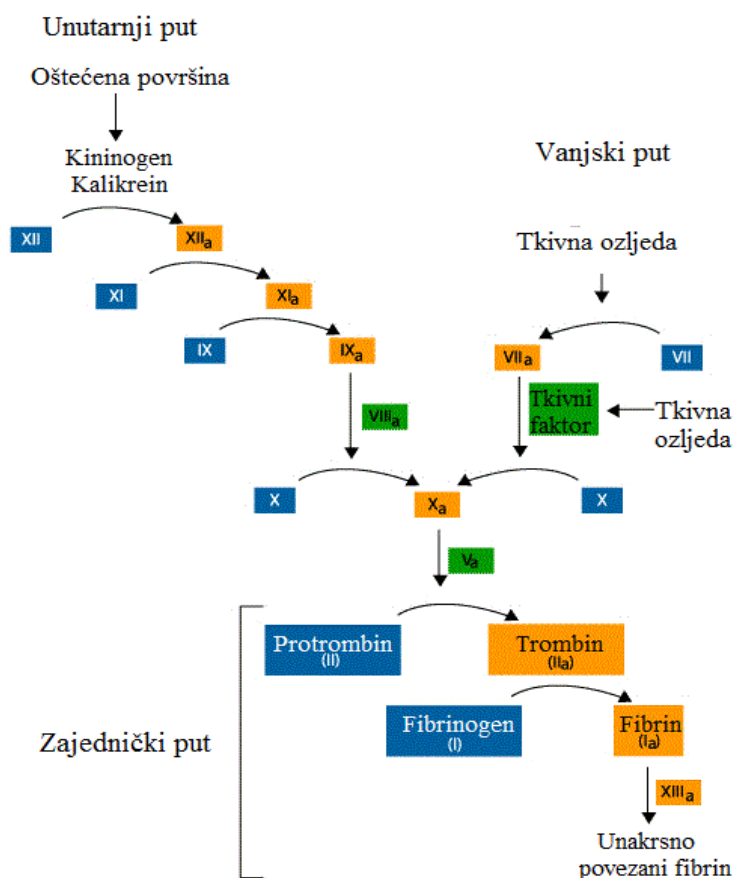
Zgrušavanje krvi je kompleksan proces koji dovodi do konverzije topljivog fibrinogena u netopljivi fibrin. Kaskada enzimskih reakcija, u kojoj sudjeluju faktori zgrušavanja i koja dovodi do formacije fibrina, omogućava amplifikaciju početnog signala nakon ozljede i regulaciju samog procesa (Burtis i sur., 2012).

Faktori zgrušavanja su plazmatski glikoproteini koji se većinom sintetiziraju u jetri. Protrombin (FII), prekalikrein, FXII, FXI, FX, FIX i FVII se u cirkulaciji nalaze u obliku proenzima, a tijekom procesa zgrušavanja prelaze u aktivne serinske proteaze, dok su kininogen visoke molekularne mase, tkivni faktor i FV i FVIII kofaktori (Labar, 2007).

Prema staničnom modelu proces zgrušavanja se može podijeliti u tri faze. U inicijaciji se stvaraju male količine aktiviranih faktora zgrušavanja, u amplifikaciji njihove koncentracije rastu, a u fazi propagacije se vežu za prokoagulantne membrane aktiviranih

trombocita te se stvara fibrinski ugrušak. Danas je i dalje u širokoj upotrebi kaskadni model koji zgrušavanje dijeli na vanjski, unutarnji i zajednički put (Versteeg i sur., 2013). Nakon ozljede najčešće se aktiviraju oba puta (Lutze, 2000), te se spajaju zajednički put koji obuhvaća završne korake u nastajanju ugruška (Burtis i sur., 2012).

Unutarnji put započinju komponente koje su već prisutne u krvi kada dođu u kontakt s nekom tvari s kojom inače nisu u kontaktu (Lutze, 2000). To su prekalikrein, kininogen velike molekularne mase, FXII i faktor XI koji se aktiviraju u kontaktu s negativno nabijenom površinom, primjerice kolagenom i endotoksinima *in vivo* ili staklom *in vitro*. Iako ovi faktori imaju ulogu u stvaranju kinina, fibrinolizi i upalnom procesu, njihova je važnost u aktivaciji sustav zgrušavanja *in vivo* zanemariva (Labar, 2007).



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz koagulacijske kaskade (preuzeto i prilagođeno s http://www.frca.co.uk/images/clotting_cascade.gif, pristupljeno 3.4.2017.)

Vanjski put je glavni put aktivacije zgrušavanja (Labar, 2007), čija je ključna komponenta tkivni faktor, poznat i pod nazivom tromboplastin, transmembranski glikoprotein koji je eksprimiran u ekstravaskularnom tkivu, osobito na fibroblastima i stanicama glatkih mišića te služi kao tzv. hemostatska ovojnica (Versteeg i sur., 2013). On se u prisutnosti

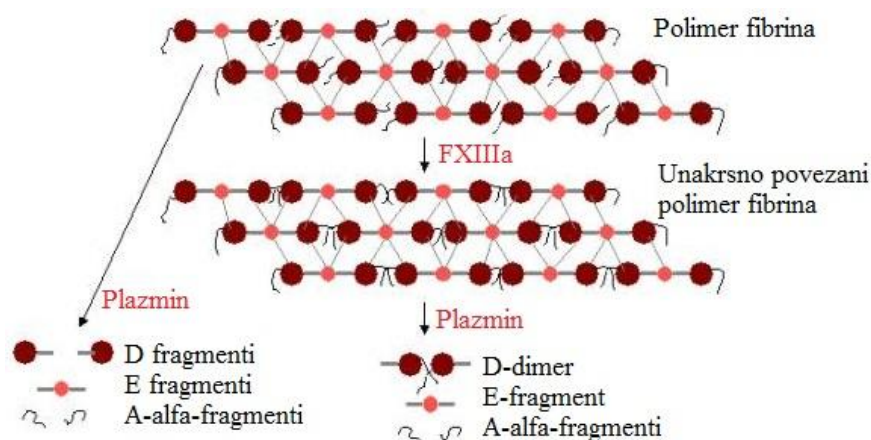
kalcija veže za FVII čime započinje koagulacijska kaskada. FVIIa aktivira FX koji svojom enzimskom aktivnošću prevodi protrombin u trombin. Trombin tada katalizira pretvorbu fibrinogena u fibrin, ali i aktivaciju FXIII, (Labar, 2007) koji posreduje u unakrsnom povezivanju fibrina, što dodatno učvršćuje strukturu ugruška (Chapin i Hajjar, 2015).

Nekontrolirano stvaranje ugrušaka sprječava sustav fizioloških inhibitora sustava zgrušavanja. Cirkulirajući inhibitori proteaza, kao što su antitrombin ili inhibitor faktora tkivnog puta, vežu se za aktivna mjesta aktiviranih faktora zgrušavanja (Versteeg i sur., 2013). Pored toga, kompleks trombina i trombomodulina, koji nastaje na površini endotelne stanice, aktivira protein C. On, u kompleksu s proteinom S, inaktivira FVa i FXIIIa čime se sprječava daljnje stvaranje trombina (Labar, 2007).

1.2.1.4. Fibrinolitički sustav

Fibrinoliza je mehanizam enzimске razgradnje unakrsno povezanog fibrina, što katalizira enzim plazmin, pri čemu nastaju topljivi fragmenti fibrina različitog sastava i molarne mase (Burtis i sur., 2012). Dvije su bitne uloge fibrinolize u hemostazi: razgradnja fibrinskog ugruška nakon što je ispunio svoju fiziološku ulogu, ali i ograničavanje stvaranja ugruška čime se održava prohodnost krvnih žila (Thomas, 1998).

Do aktivacije fibrinolize, odnosno pretvorbe plazminogena u plazmin, može doći unutarnjim putem, u čemu sudjeluju kontakti faktori FXIIa, prekalikrein i kininogen visoke molekularne mase, te vanjskim putem, preko aktivatora plazminogena: tkivnog aktivatora plazminogena (t-PA) i urokinaze (u-PA). t-PA uglavnom nastaje u endotelnim stanicama, a u krvi se nalazi u kompleksu s inhibitorom tkivnog aktivatora plazminogena (PAI-1). Urokinaza



Slika 2. Fibrinoliza (preuzeto i prilagođeno s https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2006_11/Page1.htm)

se sintetizira u epitelnim stanicama bubrežnih tubula te se u urinu nalazi u visokim koncentracijama (Thomas, 1998).

Monomeri fibrina se umrežuju u fibrinsku nit na način da se dva monomera spojena preko D-domena spajaju s trećim preko njegove E domene. Plazmin kida fibrinsku molekulu između D i E domena te nastaju topljivi fragmenti fibrina koji sadrže različiti broj D-D domena, odnosno D-dimera (Burtis i sur., 2012). D-dimeri imaju prognostičko značenje u mnogim bolestima kao što su diseminirana intravaskularna koagulacija ili duboka venska tromboza (Chapin i Hajjar, 2015).

1.2.2. Koagulacijske pretrage

Za koagulacijska mjerenja koristi se mnogo metoda, najčešće su to globalne pretrage bazirane na ugrušku i kromogene metode (Bates i Weitz, 2005). Globalni testovi ne mjere neku specifičnu komponentu već cijelu fazu hemostatskog procesa, na primjer, aktivaciju više faktora zajedno. Oni ukazuju na abnormalnost u hemostazi, ali malo govore o uzroku te abnormalnosti te je njihova osjetljivost niska (Lutze, 2000). Kromogene metode mjere razinu ili funkciju specifičnog faktora (Bates i Weitz, 2005).

Princip metoda baziranih na ugrušku je detekcija vremena od inicijacije zgrušavanja do formiranja ugruška i to mjerenjem promjena u mehaničkim svojstvima ili propuštanjem svjetla kroz uzorak. Primjerice, u jednoj od mehaničkih metoda magnet pokreće metalnu kuglicu u kiveti s uzorkom sve dok se ne stvori ugrušak koji to kretanje prekida. Od optičkih se metoda koriste nefelometrija i turbidimetrija. Kromogene metode koriste svojstva serinskih proteaza koagulacijske kaskade da kidaju oligopeptidne supstrate otpuštajući kromogene koji se optički mjere (Burtis i sur., 2012).

Primarni uzorak za koagulacijske pretrage je venska krv uzeta u spremnik s antikoagulansom natrijevim citratom. Od nje se najčešće dobiva plazma bogata trombocitima (PRP) za ispitivanje funkcije trombocita i plazma siromašna trombocitima (PPP) za većinu ostalih pretraga (Lutze, 2000). Omjer krvi i antikoagulansa treba biti 10:1, a preporučuje se da natrij citrat bude 3,2 postotni. Krv i antikoagulans se trebaju odmah promiješati kako bi se spriječilo *in vitro* zgrušavanje, a uzorci koji sadrže vidljive ugruške se ne analiziraju. Uzorci se do laboratorija trebaju prenositi na sobnoj temperaturi jer hlađenjem može doći do aktivacije trombocita i FVII te do gubitka dijela FVIII i von Willebrandovog faktora. Stabilnost uzoraka ovisi o pojedinoj metodi te o temperaturi i uvjetima skladištenja uzoraka.

Primjerice, uzorci za analizu funkcije trombocita na sobnoj su temperaturi stabilni 3 do 4 sata, a za analizu PV-a 24 sata (Bonar i sur., 2010).

Pored uobičajenih analitičkih interferencija hemolize, ikterije i lipemije, u koagulacijskim je mjerenjima vrlo bitno uzeti u obzir još neke predanalitičke čimbenike, a to su zgrušani uzorak, neprimjereni omjer krvi i antikoagulansa te kontaminacija uzorka heparinom ili nekim drugim antikoagulansom. Zgrušavanje će potrošiti faktore zgrušavanja i učiniti testove nepouzdanima. Ako se uzorkuje manji volumen od preporučenog, produžit će se vrijeme zgrušavanja zbog suviška antikoagulansa. Također, uzorci s povišenim hematokritom (>55%) trebat će smanjeni volumen antikoagulansa zbog smanjenog volumena plazme (Burtis i sur., 2012).

1.3. LABORATORIJSKI POKAZATELJI STRESA

1.3.1. Biokemijski pokazatelji stresa

Kako je već rečeno, u akutnom i kroničnom stresu dolazi do aktivacije osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda, što dobro odražava biokemijski biljeg kortizol. On se pouzdano može mjeriti u različitim biološkim materijalima, pri čemu se za određivanje njegove trenutne sistemske koncentracije koriste slina ili krv, dok se kumulativna sekrecija kortizola tijekom dužeg vremenskog perioda može mjeriti u urinu i kosi.

Kao biomarkeri aktivnosti autonomnog živčanog sustava koriste se adrenalin i noradrenalin, no njihova je loša strana što je za mjerenje potrebno pacijentu oduzeti krv. Kako bi se izbjegla invazivnost ovih metoda, posljednjih se godina kao biomarker u istraživanjima sve više koristi salivarna alfa-amilaza. Naime, njezino stvaranje i izlučivanje uključuje kontrolu autonomnog živčanog sustava, odnosno raste s njegovom aktivacijom.

Poznato je da su proupalni citokini, kao što su IL-6, IL-1 β i TNF- α , te C-reaktivni protein uključeni odgovor organizma na akutni i kronični stres. Njihova bi sekrecija u stresu mogla rasvijetliti patofiziološke procese utjecaja stresa na razvoj kroničnih bolesti, odnosno mogli bi poslužiti kao biomarkeri imunosne aktivacije u stresu (Nater i sur., 2013).

1.3.2. Koagulacijski pokazatelji stresa

Veliki broj istraživanja hemostaze ukazuje na to da akutni psihosocijalni stres dovodi do istovremene aktivacije i koagulacije i fibrinolize, s time da se koagulacija aktivira u većoj mjeri, što rezultira hiperkoagulabilnim stanjem. U tablici 1 prikazane su promjene laboratorijskih biljega koagulacije, antikoagulacije i fibrinolize u hiperkoagulabilnom stanju (von Känel i sur., 2001).

Tablica 1. Promjene laboratorijskih biljega u hiperkoagulabilnom stanju (preuzeta iz von Känel i sur., 2001)

Koagulacija	Antikoagulacija	Fibrinoliza
↓ vrijeme zgrušavanja krvi ↑ aktivnost/antigeni faktora zgrušavanja ↑ fibrinogen ↑ vWF ↑ pretrombotski markeri	↓ antitrombin III	↓ fibrinolitička aktivnost ↑ euglobulinski test ↓ aktivnost t-PA ↑ t-PA antigen ↑ aktivnost/antigen PAI-1

U daljnjem tekstu biti će detaljnije objašnjene neke osnovne koagulacijske pretrage koje služe za procjenu stanja hemostaze, te mogu ukazati na eventualnu značajniju aktivaciju sustava zgrušavanja i fibrinolize za vrijeme psihičkog stresa. Ipak, takozvani pretrombotski markeri, poput D-dimera ili fibrinopeptida A, mnogo su osjetljiviji u detekciji hiperkoagulabilnog stanja od uobičajenih koagulacijskih metoda kao što su PV, euglobulinski test i aktivnosti faktora zgrušavanja. Njihove povišene koncentracije ukazuju na pojačanu koagulacijsku aktivnost, a onda i fibrinolitičku aktivaciju, i prije same pojave tromboze (von Känel i sur., 2001).

1.3.2.1. Globalne pretrage: PV, APTV i TV

Protrombinsko vrijeme (PV) je metoda bazirana na ugrušku koja odražava aktivnost vanjskog i zajedničkog puta zgrušavanja (Burtis i sur., 2012) odnosno ukazuje na postojanje poremećaja u jednom od faktora protrombinskog kompleksa (FII, FVII, FX), FV ili fibrinogenu. Određuje se zbog praćenja terapije s antagonistima vitamina K te kod praćenja deficijencije vitamina K i bolesti jetre, te predoperativno (Thomas, 1998). Svaki pripravak tromboplastina ima različitu osjetljivost na nedostatak pojedinih faktora zgrušavanja pa je potrebno da se svaki pripravak baždari prema internacionalnom referentnom tromboplastinu i da ima ISI vrijednost (Internacionalni indeks osjetljivosti) (Labar, 2007).

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) je metoda bazirana na ugrušku koja odražava aktivnost unutarnjeg i zajedničkog puta zgrušavanja. Aktivacija kontaktnih faktora postiže se dodatkom aktivatora, najčešće s negativno nabijenom površinom, poput kaolina. APTV se određuje zbog praćenja terapije s heparinom te za detekciju deficijencija faktora unutarnjeg i zajedničkog puta te njihovih inhibitora (Burtis i sur., 2012). Također, APTV može biti produženo i zbog drugih stanja, poput bolesti jetre (<http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=226>).

Trombinsko vrijeme (TV) je metoda bazirana na ugrušku koja odražava pretvorbu fibrinogena u fibrinski monomer uz pomoć trombina te polimerizaciju fibrinskih monomera, a određuje se tako da se u citratnu plazmu dodaje mala količina trombina te se mjeri vrijeme nastajanja ugruška (Burtis i sur., 2012). Patološke vrijednosti trombinskog vremena prisutne su kod različitih deficijencija (hipofibrinogenemija) ili abnormalnosti (disfibrinogenemija) fibrinogenske molekule. Nadalje, prisutnost heparina ili hirudina, degradacijskih produkata fibrina ili fibrinogena te patoloških inhibitora također će dovesti do patoloških vrijednosti TV-a (Lutze, 2000).

1.3.2.2. *Fibrinogen*

Fibrinogen je protein koji se u krvi nalazi u koncentraciji od 2 do 4 mg/mL. Sastoji se od dva seta od po tri različita polipeptidna lanca povezana disulfidnim vezama ($A\alpha$, $B\beta$ i γ). Trombin uklanja N-terminalne fibrinopeptide A i B, pri čemu nastaju monomeri fibrina koji se dalje umrežuju preko lizinskih ostataka tvoreći fibrinski ugrušak (Chapin i Hajjar, 2015).

Fibrinogen je pozitivni reaktant akutne faze što znači da njegova koncentracija raste u upalnim stanjima, te se tradicionalno smatra rizičnim faktorom za razvoj KVB jer potiče formiranje ugrušaka. Studije su pokazale povezanost stresa s povišenom koncentracijom fibrinogena u plazmi (Lazzarino i sur., 2013). Uz to, mjerenje fibrinogena je indicirano za detekciju urođenih deficijencija fibrinogena, poput afibrinogenemije, te za praćene trombolitičke terapije (Thomas, 1998). Osim u upalama i infekcijama, vrijednosti fibrinogena povišene su i nakon operativnog zahvata, traume ili opekline, akutnog infarkta miokarda, nefrotskog sindroma ili zloćudnih bolesti. Fibrinogen može, primjerice, biti snižen u bolestima jetre, u akutnim krvarenjima te kod nasljednog nedostatka ili defekata fibrinogena (<http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=752>).

1.3.2.3. *Fibrinoliza*

Globalna fibrinolitička aktivnost plazme ispituje se euglobulinskim testom. Pokazano je da hipofibrinoliza izmjerena ovim testom ima prediktivnu vrijednost za razvoj venske tromboze te da je koristan u predviđanju infarkta miokarda kod muških osoba ispod 50 godina, dok se hiperfibrinoliza nije pokazala korisnom u predviđanju bolesti krvarenja (Chapin i Hajjar, 2015). Smanjene vrijednosti euglobulinskog testa nalazimo kod različitih stanja hiperfibrinolize poput ciroze jetre, ali i kod malignih bolesti, trombolitičke terapije, sepse i drugih stanja. Usporenu fibrinolizu, odnosno povećane vrijednosti euglobulinskog testa nalazimo kod poremećaja fibrinolitičkog sustava zbog povećane aktivnosti t-PA, te u tromboembolijskim i drugim stanjima (<http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=58>).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rad u zdravstvu sa sobom donosi brojne odgovornosti i posebne obrasce rada. Dvadesetčetverosatna dežurstva predstavljaju čest izvor stresa za liječnike te mogu utjecati na njihovo zdravlje. Dosadašnja istraživanja povezuju izloženost stresu na radnom mjestu s poremećajem hemostaze u vidu nastanka hiperkoagulabilnog stanja. Fibrinogen, kao bitna komponenta hemostaze, igra značajnu ulogu i u formiranju aterosklerotskog plaka. Sve to ukazuje na povećani rizik od razvoja kardiovaskularnih bolesti kod liječnika. U ovom smo radu željeli ispitati u kojoj mjeri pojedinačno dvadesetčetirisaatno dežurstvo utječe na aktivaciju sustava koagulacije i fibrinolize, odnosno dolazi li, barem kratkotrajno, do dovoljno jakog dizbalansa da to možemo detektirati najosnovnijim koagulacijskim pretragama.

Cilj diplomskog rada:

Ispitati utjecaj akutnog stresa kao posljedice dvadesetčetirisaatnog dežurstva na koagulabilnost krvi kod liječnika na specijalističkom usavršavanju.

Specifični ciljevi:

1. Odrediti APTV, PV, TV, fibrinogen i vrijeme fibrinolize u uzorcima ispitanika prije, tijekom i nakon dvadesetčetirisaatnog dežurstva.
2. Utvrditi je li došlo do promjene u vrijednostima navedenih parametara tijekom i nakon dvadesetčetirisaatnog dežurstva u odnosu na vrijednosti prije dežurstva.
3. Dobivene rezultate staviti u kontekst dosadašnjih znanja o utjecaju stresa na hiperkoagulabilnost krvi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Ispitanici su liječnici na specijalističkom usavršavanju kojima je rad povremeno organiziran u obliku dvadesetčetverosatnog dežurstva. Ukupni broj ispitanika je 29, od toga je 15 žena i 14 muškaraca. Dob ispitanika je u rasponu od 28 do 41 godine, s medijanom od 31 godine.

Iz istraživanja su isključene trudnice, korisnice hormonske terapije, osobe s pozitivnom anamnezom tromboembolijskih incidenata i nikotinizma, osobe s akutnom infektivnom bolesti i osobe koje imaju indeks tjelesne mase manji od 18.5 i veći od 25 kg/m². Također, isključeni su ispitanici kojima je vrijeme od zadnjeg dežurstva kraće od 5 dana kako bi dobiveni rezultati bili posljedica samo akutne izloženosti stresu.

Svi su ispitanici potpisali informirani pristanak i suglasnost na tri venepunkcije u aseptičnim uvjetima, izvedene od stručnog medicinskog osoblja bolničkog centra. Jedinim osobnim podacima uzeti od ispitanika bili su dob i spol.

3.2. UZORKOVANJE

Uzorci venske krvi ispitanika dobiveni su venepunkcijom na radnom mjestu u tri navrata. Prvo uzorkovanje provedeno je 15 minuta prije početka dvadesetčetirisaatnog dežurstva. Drugo uzorkovanje provedeno je 12 sati nakon početka dežurstva. Treće uzorkovanje provedeno je 24 sata nakon početka dežurstva.

Krv je izvađena iz kubitalne vene u epruvetu s plavom bojom čepa koja sadrži 3,2%-tni Na-citrat. Mjesto uboda trebalo je prethodno dezinficirati alkoholom i pustiti da se osuši, dok je podvezu, koja se koristi za povećanje tlaka u venama kako bi bile vidljivije, trebalo držati najviše minutu, kako ne bi došlo do hemokoncentracije. Korištene epruvete s vakuumom osigurale su odgovarajući volumen krvi kako bi omjer krvi i antikoagulansa bio 10:1 (9 dijelova krvi i 1 dio antikoagulansa). Dozvoljeno je odstupanje volumena krvi za maksimalno 10% od oznake na epruveti. Nakon što se epruveta napunila krvlju morala se 3 do 4 puta okrenuti kako bi došlo do miješanja krvi i antikoagulansa.

3.3. PRIPREMA UZORKA

Nakon uzorkovanja potrebno je uzorak upisati u laboratorijski informacijski sustav (LIS) kako bi mu se dodijelio jedinstveni bar kod kojim se označava epruveta. Na taj se način

smanjuje mogućnost zamjene uzorka, te omogućava lakše praćenje uzorka tijekom analize. Analitički uzorak za sve pretrage je plazma siromašna trombocitima (PPP), pa je u svrhu njezinog dobivanja potrebno centrifugirati primarni uzorak pune krvi 10 minuta na 4000 okretaja/min.

3.4. AUTOMATIZIRANE METODE

Pretrage PV, APTV, TV i fibrinogen izvode se na automatskom koagulometru Behring Coagulation System XP (BCS XP) tvrtke Siemens.

3.4.1. Kalibracija i kontrola kvalitete

APTV i TV se ne kalibriraju jer ih analizator mjeri izravno u sekundama. PV se izražava kao postotak aktivnosti pa je za njega potrebna kalibracijska krivulja, a isto vrijedi i za fibrinogen koji se izražava u g/L. Kalibrator za određivanje PV-a je *PT Multi Calibrator*, a za određivanje *fibrinogena Fibrinogen Calibrator kit*. Postupak kalibracije se provodi nakon svake promjene serijskog broja reagensa za tu pretragu te u slučaju da postupak redovne unutarnje analitičke kontrole ne zadovoljava kriterije prihvatljivosti kontrolnog postupka. Svako pakiranje navedenih reagensa sadrži 6 komercijalnih kalibratora s naznačenim vrijednostima koji služe za izradu kalibracijske krivulje.

Neposredno nakon postupka kalibracije izvodi se postupak unutarnje analitičke kontrole s normalnim i patološkim komercijalnim kontrolnim plazmama, čime se provjerava i potvrđuje provedena kalibracija. U slučaju da su rezultati kontrolnog postupka neprihvatljivi, potrebno je ponoviti kalibraciju, a onda i postupak unutarnje analitičke kontrole. Uz to, postupak unutarnje analitičke kontrole se provodi svakog dana prije početka rada na analizatoru, zatim kada se stavlja novi reagens istog serijskog broja, kada se sumnja na ispravnost analizatora i nakon servisnog postupka.

3.4.2. Određivanje PV-a

3.4.2.1. *Reagensi*

Reagens za određivanje PV-a je jednokomponentan:

- *Dade ® Innovin ® Reagent* je liofilizirani reagens koji se sastoji od rekombinantnog humanog tkivnog faktora i sintetičkih fosfolipida (tromboplastina), kalcijevih iona, komponente koja neutralizira heparin, pufera i stabilizatora.

Reagens je potrebno pripremiti otapanjem u 10 mL destilirane vode i ostaviti 15 min na sobnoj temperaturi prije uporabe.

3.4.2.2. *Načelo i postupak*

Plazma siromašna trombocitima najprije se inkubira s optimalnom količinom tkivnog tromboplastina i kalcijevih iona pri čemu dolazi do aktivacije vanjskog i zajedničkog puta zgrušavanja te se mjeri vrijeme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška. Izmjereno vrijeme u sekundama se automatski preračunava u postotak aktivnosti od normale na temelju kalibracijske krivulje dobivene komercijalnim kalibracijskim plazmama.

Tromboplastinski reagens sadrži tkivni faktor koji započinje vanjski put, kalcij koji je potreban za aktivaciju faktora zgrušavanja te fosfolipide koji služe kao podloga za odvijanje reakcija koagulacijske kaskade. Rezultati se izražavaju kao omjer srednjih vrijednosti protrombinskog vremena bolesnikove plazme i normalne kontrolne plazme.

3.4.3. Određivanje APTV-a

3.4.3.1. *Reagensi*

Reagens za određivanje APTV-a je dvokomponentan:

- *Dade ® Actin ® FS* sadrži pročišćene fosfolipide soje u elaginskoj kiselini s dodanim puferom, stabilizatorima i konzervansima.
- *CaCL₂ Solution* 0,025 mol/L

Oba reagensa su spremna za upotrebu.

3.4.3.2. *Načelo i postupak*

Faktori zgrušavanja unutarnjeg puta aktiviraju se inkubacijom plazme s optimalnom količinom fosfolipida i površinskog aktivatora. Nakon inkubacije dodaju se kalcijevi ioni zbog čega započinje proces zgrušavanja koji rezultira pretvorbom fibrinogena u fibrin. Vrijeme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška mjeri se u sekundama. Analizator automatski preračunava izmjereno vrijeme u omjer tako da APTV izmjeren u sekundama u plazmi ispitanika podijeli sa srednjom vrijednosti referentnog intervala APTV-a za korišteni reagens što je zadano u kompjuterskom programu analizatora.

3.4.4. Određivanje fibrinogena

3.4.4.1. *Reagensi*

Reagens je jednokomponentan:

- *Multifibren*® U sadrži goveđi trombin, peptid koji usporava agregaciju fibrina, kalcij klorid, heksadimetrim bromid, polietilen glikol, natrijev klorid, Tris, goveđi albumin i natrijev azid kao konzervans.

Reagens je potrebno otopiti u 5 mL destilirane vode i ostaviti na sobnoj temperaturi 15 do 30 min prije upotrebe.

3.4.4.2. *Načelo i postupak*

Metoda određivanja fibrinogena je modifikacija Claussove metode. Uzorku plazme dodaje se trombinski reagens u suvišku što dovodi do pretvorbe fibrinogena u fibrin. Mjeri se vrijeme zgrušavanja u sekundama pri čemu je brzina stvaranja ugruška razmjerna koncentraciji fibrinogena u plazmi. Analizator automatski preračunava izmjereno vrijeme u koncentraciju (g/L) na temelju kalibracijske krivulje dobivene komercijalnim kalibracijskim plazmama.

3.4.5. Određivanje TV-a

3.4.5.1. *Reagensi*

Reagens priređen za upotrebu je jednokomponentan, a kit sadrži:

- *BC Thrombin Reagent* koji sadrži liofilizirani goveđi trombin i goveđi albumin
- *Buffer Solution for BC Thrombin Reagent* koji sadrži HEPES, pH 7,4, i konzervanse

Reagens se priprema otapanjem liofilizata reagensa u 5 mL puferske otopine koja se nalazi u originalnom pakiranju

3.4.5.2. *Načelo i postupak*

Nakon dodatka trombinskog reagensa određuje se vrijeme zgrušavanja citratne plazme. Trombin iz reagensa prevodi fibrinogen u fibrin te se turbidimetrijski mjeri vrijeme u sekundama potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška.

3.5. NEAUTOMATIZIRANA METODA: EUGLOBULISNKI TEST

3.5.1. Reagensi

- Octena kiselina (1%)
- Boratno pufer, pH 7,6%
- Otopina kalcijevog klorida 0,025 mol/L

3.5.2. Načelo i postupak

U epruvetu od 10 mL otpipetira se 9 mL destilirane vode, 100 μ L 1%-tne octene kiseline i 500 μ L uzorka, epruveta se lagano promiješa i ostavi 30 min u hladnjaku, pri čemu nastaje precipitat, tzv. euglobulinska frakcija koja sadrži aktivator plazminogena, plazminogen, PAI-1 i fibrinogen. Nakon stajanja i centrifugiranja 10 minuta na 4000 okretaja, supernatant se odlije, a epruveta s preostalim sadržajem ostavi 5 minuta u obrnutom položaju na stalku. Epruveta se premjesti u vodenu kupelj na 37°C te joj se dodaje 500 μ L boratnog pufera kako bi se nastali precipitat bogat fibrinolitičkim sastavnicama otopio, a dodatkom 500 μ L CaCl_2 istaloži se fibrinogen te nastaje ugrušak. Vrijeme nastanka ugruška zabilježi se te se svakih 15 minuta makroskopski prati vrijeme liziranja tog ugruška. Rezultat se izražava kao vrijeme u minutama u kojem se makroskopskim pregledom utvrdi potpuna liza precipitata, odnosno kada on iz mliječno bijelog prijeđe u proziran.

3.6. STATISTIČKE METODE

Za statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Microsoft Excel 2010 (© Microsoft Corporation) i MedCalc v.17.4 (© 1993-2017 MedCalc Software). Korištenjem deskriptivne statistike dobiveni su podaci o aritmetičkoj sredini, njezinom 95%-tnom intervalu pouzdanosti, standardnoj devijaciji, medijanu i njegovom 95%-tnom intervalu pouzdanosti, minimumu i maksimumu te interkvartilnom rasponu (25-75 P). Normalna distribucija podataka ispitivana je D'Agostino-Pearsonovim testom, na temelju kojeg se opredjeljujemo za parametrijske ili neparametrijske testove za uspoređivanje skupova podataka. Svi su rezultati interpretirani s razinom značajnosti $\alpha = 0,05$.

Analiza varijance za normalno distribuirane uzorke učinjena je jednosmjernim ANOVA testom kojim se uspoređuju rezultati jedne zavisne varijable s jednom nezavisnom varijablom koja ima više različitih skupina ili kategorija. Za varijable koje nisu distribuirane

po Gaussovoj razdiobi korišten je Kruskal-Wallisov neparametrijski test, koji je za razliku od ANOVA-e baziran na medijanu, a ne aritmetičkoj sredini.

Za grafički prikaz rezultata koristio se box and whisker dijagram (slike x do y) u kojem centralni zeleni kvadrat predstavlja vrijednosti između 1. i 3. kvartila, a središnja zelena linija u kvadratu predstavlja medijan. Vertikalna zelena linija proteže se od minimalne do maksimalne vrijednosti s time da su isključene outside vrijednosti, koje su 1,5 puta veće od interkvartilnog raspona, te *far out* vrijednosti koje su 3 puta veće od interkvartilnog raspona. Narančasti kružić označava srednju vrijednost, a crvena linija povezuje srednje vrijednosti 3 mjerenja. Plava linija predstavlja 95%-tni interval pouzdanosti za medijan.

Za ispitivanje korelacije između varijabli koje su normalno distribuirane računao se Pearsonov koeficijent korelacije i njegova neparametrijska verzija, Spearmanov koeficijent korelacije ranga s pridruženom statističkom značajnosti P. Koeficijent korelacije može poprimiti vrijednost između -1 i 1, a što je ona bliža nuli, to je korelacija slabija. Ako se jedna varijabla povećava povećavanjem druge, korelacija će biti pozitivna, a ako se jedna varijabla smanjuje dok se druga povećava, korelacija će biti negativna. Koeficijent korelacije tumačen je prema Coltonu (Tablica 2).

Tablica 2. Tumačenje koeficijenta korelacije prema Coltonu

Koeficijent korelacije	Povezanost
0 do $\pm 0,25$	Nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	Slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	Umjerena do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do ± 1	Dobra do izvrsna povezanost

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. DESKRIPTIVNA STATISTIKA REZULTATA MJERENJA

U tablici 2 prikazani su statistički obrađeni rezultati mjerenja 5 koagulacijskih parametara u skupini od N=29 ispitanika, u sve tri točke uzorkovanja krvi. Uz podatke deskriptivne statistike u tablici su prikazane P-vrijednosti dobivene D'Agostino-Pearsonovim testom za svaku točku mjerenja zasebno. One ukazuju da varijable fibrinogen, PV i TV slijede Gaussovu normalnu distribuciju jer im je P-vrijednost veća od nivoa signifikantnosti 0,05. Vrijednosti fibrinolize nisu normalno distribuirane te je kod nje maksimalna vrijednost ujedno i mod, odnosno vrijednost s najvećom frekvencijom pojavljivanja. Iako se P-vrijednosti za

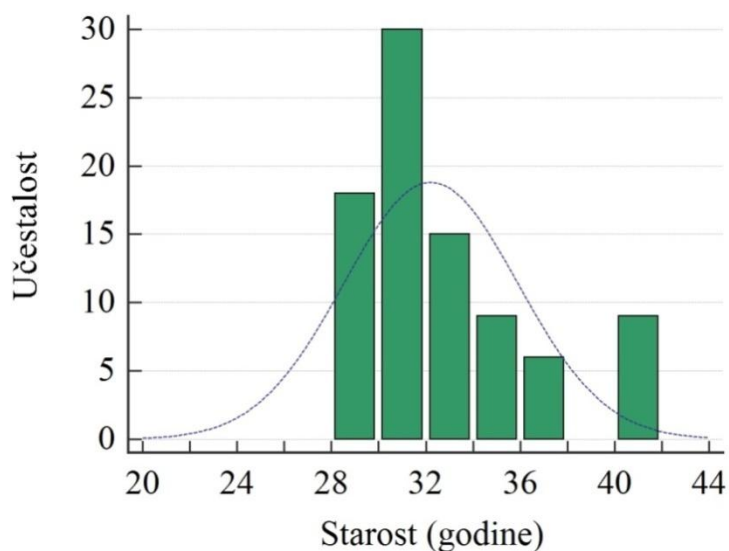
Tablica 3. Deskriptivna statistika

Variable	1. uzorkovanje								
	\bar{x}	95% CI	SD	M	95% CI	Min	Max	25-75 P	P
APTV (omjer)	0,94	0,9 - 1,0	0,099	0,9	0,9 - 1,0	0,7	1,2	0,9 - 1,0	0,685
APTV [s]	26,0	25,0 - 27,0	2,72	26	24,9 - 27,3	21	32	24,2 - 27,5	0,691
Fibrinogen [g/L]	2,60	2,4 - 2,8	0,478	2,4	2,3 - 2,8	1,9	3,6	2,2 - 3,0	0,215
Fibrinoliza [min]	166,9	149,6-184,2	45,40	180	120,0 - 210,0	90	210	120,0 - 210,0	<0,0001
PV [% aktivnosti]	99,3	93,8 - 104,7	14,33	100	91,7 - 107,3	69	126	90,8 - 108,1	0,764
Starost (godine)	32,2	30,8 - 33,6	3,74	31	30,0 - 33,0	28	41	30,0 - 34,3	0,028
TV [s]	18,9	18,5 - 19,3	1,04	19	18,4 - 19,0	17	22	18,2 - 19,4	0,087
Variable	2. uzorkovanje								
	\bar{x}	95% CI	SD	M	95% CI	Min	Max	25-75 P	P
APTV (omjer)	0,96	0,9 - 1,0	0,104	1,0	0,9 - 1,0	0,7	1,2	0,9 - 1,0	0,045
APTV [s]	26,5	25,4 - 27,6	2,87	26	25,3 - 27,6	21	35	24,2 - 27,9	0,046
Fibrinogen [g/L]	2,51	2,3 - 2,7	0,469	2,4	2,2 - 2,7	1,8	3,6	2,2 - 2,8	0,248
Fibrinoliza [min]	128,5	110,9-146,0	46,20	120	103,8 - 140,0	60	210	90,0 - 157,5	0,217
PV [% aktivnosti]	96,6	90,9 - 102,4	15,15	97	88,2 - 108,2	66	123	86,2 - 109,7	0,431
Starost (godine)	32,2	30,8 - 33,6	3,74	31	30,0 - 33,0	28	41	30,0 - 34,3	0,028
TV [s]	18,6	18,2 - 19,1	1,28	19	17,9 - 19,1	17	21	17,5 - 19,2	0,086
Variable	3. uzorkovanje								
	\bar{x}	95% CI	SD	M	95% CI	Min	Max	25-75 P	P
APTV (omjer)	0,96	0,9 - 1,0	0,098	1,0	0,9 - 1,0	0,7	1,2	0,9 - 1,0	0,049
APTV [s]	26,5	25,4 - 27,5	2,69	26	25,5 - 27,5	21	34	25,1 - 27,9	0,050
Fibrinogen [g/L]	2,58	2,4 - 2,8	0,489	2	2,3 - 2,8	1,9	3,7	2,2 - 3,0	0,184
Fibrinoliza [min]	166,7	147,9-185,6	49,55	190	140,3 - 210,0	80	210	120,0 - 210,0	0,032
PV [% aktivnosti]	97,2	91,6 - 102,8	14,69	99	88,9 - 104,9	68	123	87,7 - 107,7	0,652
Starost (godine)	32,2	30,8 - 33,6	3,73	31	30,0 - 33,0	28	41	30,0 - 34,3	0,028
TV [s]	18,8	18,4 - 19,3	1,28	19	18,2 - 19,5	15	21	18,1 - 19,6	0,118

\bar{x} -aritmetička sredina, 95% CI -95%-tni interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu, odnosno medijan, SD-standardna devijacija, M-medijan, Min-minimum, Max-maksimum, 25-75 P-raspon između 25. i 75. percentila, P-vjerojatnost normalne distribucije

APTV (izraženo kao omjer i u sekundama) u 2. i 3. točki uzorkovanja nalaze u graničnom području, dalje smo ih podvrgli parametrijskom ANOVA testu.

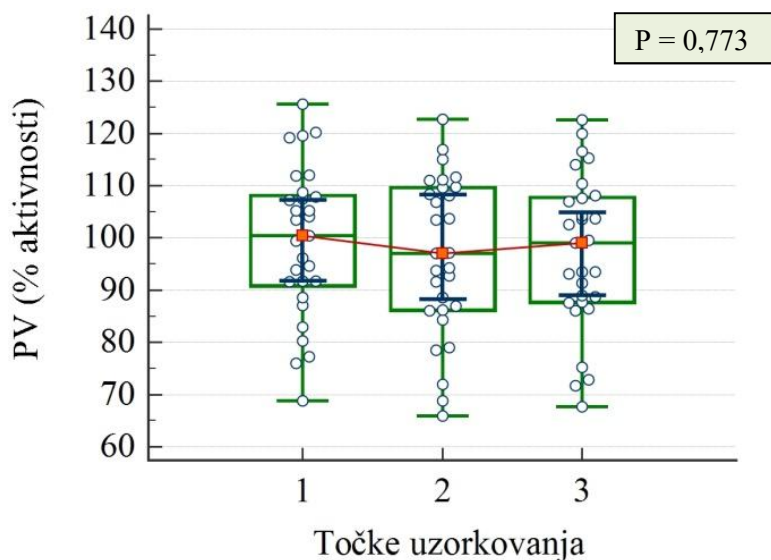
Dob ispitanika ne slijedi normalnu raspodjelu jer D'Agostino-Pearsonovim testom dobivena P-vrijednost iznosi 0,0005 (slika 3). Raspon godina je od 28 do 41, s time da je medijan 31, zbog čega nismo donosili zaključke o njihovom utjecaju na doživljaj stresa niti samu analizu.



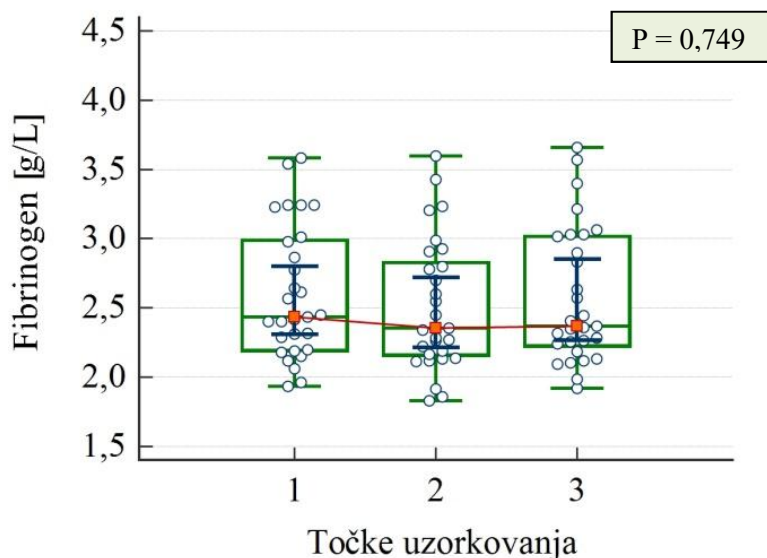
Slika 3. Raspodjela ispitanika po dobi

4.2. USPOREDBA REZULTATA S OBZIROM NA VRIJEME UZORKOVANJA

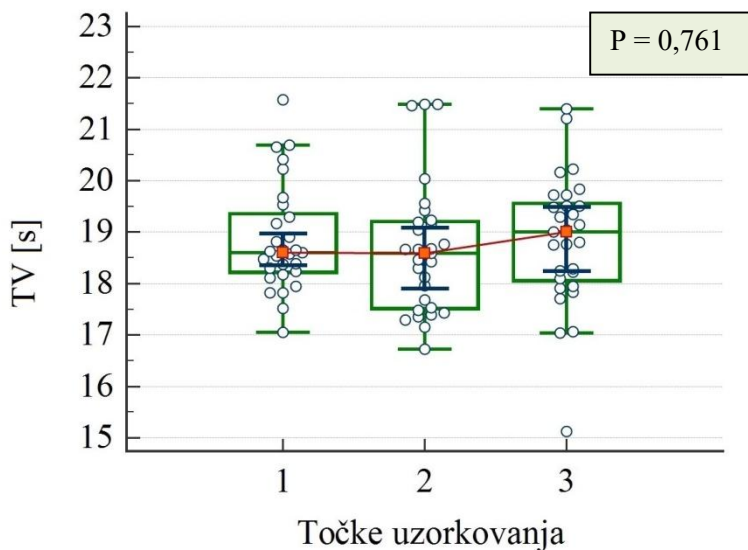
Jednosmjernim ANOVA testom ispitali smo razlikuju li se izmjerene, normalno distribuirane vrijednosti (zavisne varijable) s obzirom na vrijeme uzorkovanja (nezavisne varijable). Dobivene P-vrijednost za PV, TV i fibrinogen veće su od nivoa signifikantnosti 0,05, što znači da za izmjerene vrijednosti nema statistički značajne razlike s obzirom na vrijeme uzorkovanja, što je grafički prikazano na slikama 4, 5 i 6.



Slika 4. Usporedba rezultata PV-a s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Točke uzorkovanja: 15 min prije početka dežurstva te 12 i 24 sata nakon početka dežurstva

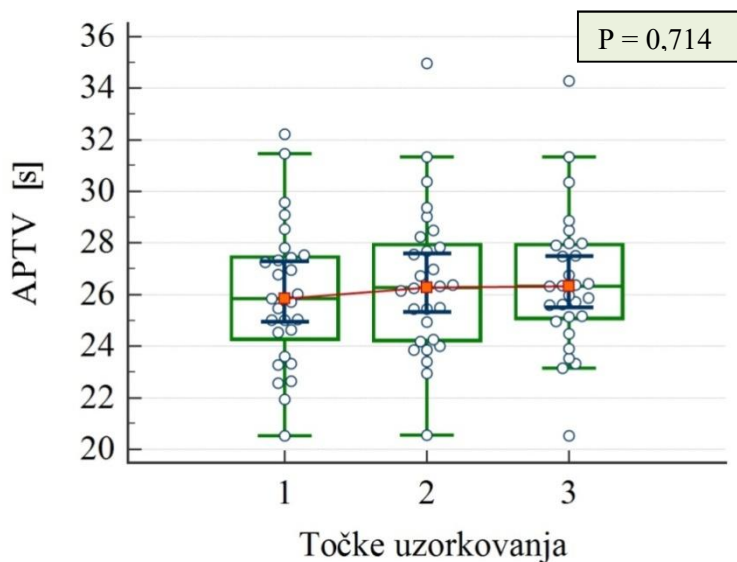


Slika 5. Usporedba koncentracija fibrinogena s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Točke uzorkovanja: 15 min prije početka dežurstva te 12 i 24 sata nakon početka dežurstva



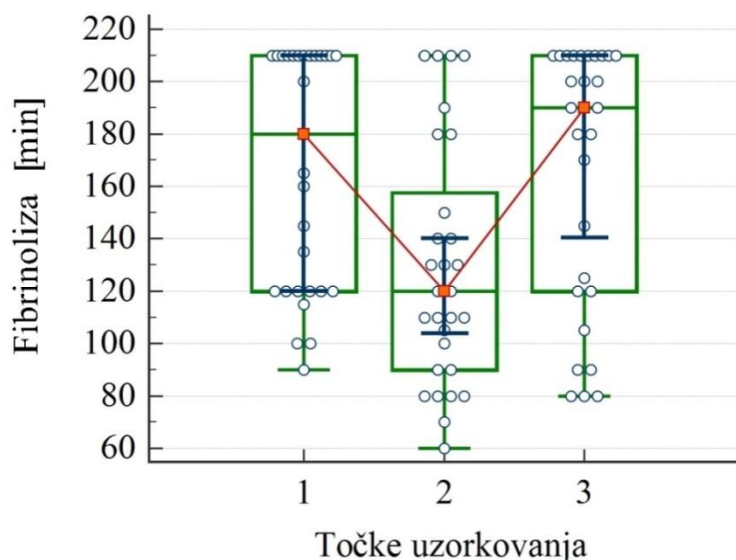
Slika 6. Usporedba rezultata TV-a s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Točke uzorkovanja: 15 min prije početka dežurstva te 12 i 24 sata nakon početka dežurstva

Na temelju aritmetičke sredine i medijana za APTV moglo bi se zaključiti da tijekom dvadesetčetverosatnog dežurstva dolazi do povećanja vrijednosti. Međutim, rezultati Kruskal-Wallisovog neparametrijskog testa pokazali su da nema statistički značajne razlike između mjerenja u različitim vremenima uzorkovanja kao što je prikazano na slici (slika 7). Naime, P-vrijednost za APTV izražen kao omjer je 0,725, a za APTV u sekundama $P=0,714$.



Slika 7. Usporedba rezultata APTV-a izraženog u sekundama s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Točke uzorkovanja: 15 min prije početka dežurstva te 12 i 24 sata nakon početka dežurstva

Kruskal-Wallisovim testom pokazalo se da postoji statistički značajna razlika u izmjerenim vrijednostima fibrinolize između barem dvije točke uzorkovanja ($P=0,0043$). Daljnjom post hoc analizom utvrđeno je da ta razlika proizlazi iz razlike između prvog i drugog mjerenja, te drugog i trećeg mjerenja, odnosno da je vrijeme fibrinolize kraće navečer nego ujutro prije i nakon dežurstva, što se može vidjeti na slici x.



Slika 8. Usporedba rezultata fibrinolize s obzirom na vrijeme uzorkovanja. Točke uzorkovanja: 15 min prije početka dežurstva te 12 i 24 sata nakon početka dežurstva

Sve navedene testove napravili smo i posebno za mušku i žensku populaciju, iako male razlike postoje, one nisu statistički značajne.

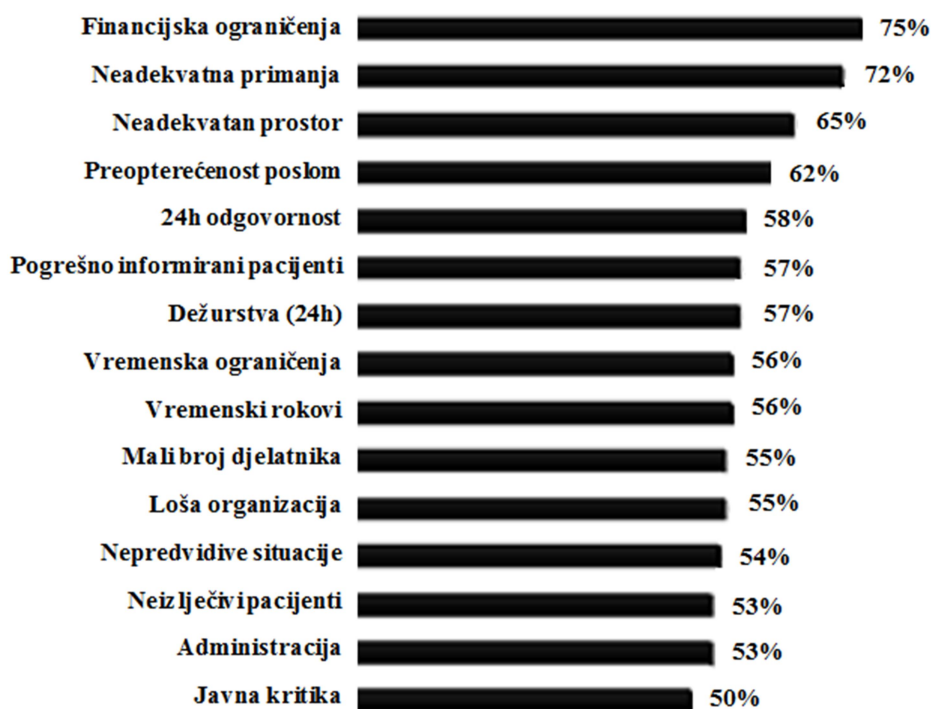
4.3. ISPITIVANJE KORELACIJE

Računanjem Pearsonovog i Spearmanovog koeficijenta korelacije za svaki par varijabli utvrđeno je da kod većine ispitivanih varijabli nema međusobne značajne korelacije. Primijećena je umjerena povezanost vrijednosti PV-a i APTV-a (koeficijent korelacije=-0,558, $P<0,0001$), te PV-a i fibrinogena (koeficijent korelacije=0,551, $P<0,0001$) u uzorku ispitanika $N=29$. Kada smo uspoređivali vrijednosti kod muške populacije ($N=14$) nađena je dobra povezanost vrijednosti PV-a i fibrinogena (koeficijent korelacije=0,757, $P<0,0001$). Kod ženske populacije ($N=15$) dobro koreliraju vrijednosti PV-a s APTV-om, s koeficijentom korelacije -0,715 za omjer i -0,714 za APTV u sekundama ($P<0,0001$).

4.4. RASPRAVA

Brojni radovi dokazuju povezanost stresa na radnom mjestu s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Rad liječnika u dvadesetčetverosatnom dežurstvu ne samo da je fizički naporan zbog nedostatka odmora i sna, već predstavlja i psihosocijalno opterećenje zbog odgovornosti za pacijente, a često i vremenske ograničenosti za donošenje odluka. U studiji koju su proveli Tür i suradnici dokazano je da se liječnici različitih specijalnosti koji rade u noćnim smjenama često suočavaju sa stresom (Tür i sur., 2016). Uz to, mladi liječnici na specijalističkom usavršavanju mogu biti nesigurniji zbog nedostatka iskustva. U gore navedenoj studiji dokazano je da su takvi liječnici pod većim stresom od starijih kolega te da imaju manju kontrolu nad poslom.

Za naše ispitivanje odabrali smo upravo mlade liječnike na specijalističkom usavršavanju. Za potrebe ovog rada nismo proveli upitnik o dvadesetčetirisatnom dežurstvu kao stresoru kod liječnika, no iz dosadašnje literature pretpostavili smo da je on prisutan i među našim ispitanicima koji svi rade u bolnicama u Zagrebu. Naime, istraživanje provedeno u Zagrebu 2009. godine na 1900 zdravstvenih djelatnika u bolnicama ispitivalo je njihov doživljaj određenih stresora na radu te razlikuje li se taj doživljaj stresa između liječnika i medicinskih sestara, odnosno tehničara. Pokazalo se da su glavni stresori kod liječnika vezani



Slika 9. Najčešći stresori na radu ocijenjeni od liječnika s ocjenom 4 i 5 na Likertovoj ljestvici (1-5) (Knežević i sur., 2009)

uz financijske mogućnosti, organizaciju i neadekvatan prostor, no dvadesetčetirisatna dežurstva su također svrstana među najčešće stresore među liječnicima, kako je prikazano na slici 9 (Knežević i sur., 2009).

Naše istraživanje obuhvatilo je gotovo podjednako muškarce (N=14) i žene (N=15), no značajne razlike između spolova nisu uočene te ne možemo donositi zaključke o različitom utjecaju dvadesetčetirisatnog dežurstva na muškarce i žene. Ipak, Santhi i sur. u svom radu pokazuju da žene teže podnose noćne smjene nego muškarci te su pod većim rizikom od ozljeda na radu tijekom produženog radnog vremena ili nestandardnih obrazaca rada (Santhi i sur., 2016).

Populacija obuhvaćena našim istraživanjem su mladi liječnici (medijan za godine je 31), te stoga nismo zaključivali o povezanosti stresa i dobi. S druge strane, odabirom tako uskog raspona u godinama mogli smo zanemariti utjecaj kardiovaskularnih oštećenja koja se gomilaju s godinama na rezultate analize što nam je omogućilo promatranje samo akutnih promjena u hemostazi.

Dobiveni rezultati pokazali su da nema statistički značajne promjene u koagulacijskim parametrima: PV-u, APTV-u, TV-u i koncentraciji fibrinogena 12 i 24 sata nakon početka dežurstva u odnosu na vrijednosti 15 minuta prije početka dvadesetčetirisatnog dežurstva, dok je vrijeme fibrinolize pokazalo značajne promjene vrijednosti. Međutim, to ne znači da tijekom dežurstva nije došlo do aktivacije koagulacijskog sustava, već da provedene analize koje odražavaju aktivaciju koagulacijske kaskade nisu dovoljno osjetljive na njezine male promjene. Hemostaza je vrlo dobro regulirani sustav te aktivacijom koagulacije dolazi i do aktivacije sustava fibrinolize upravo kako ne bi došlo do hiperkoagulabilnosti i nastanka lokalnih ugrušaka. Zbog toga se eventualne promjene nisu odrazile na rezultate mjerenja.

Na to da i kratke epizode stresa na radnom mjestu mogu dovesti do aktivacije koagulacije ukazuje studija provedena 2011. godine u Češkoj na skupini 13 zdravih liječnika s odjela intenzivne skrbi. U studiji se proučavao upalni i mikrovaskularni odgovor te koagulacijske promjene koje nastaju zbog dvadesetčetirisatnog dežurstva. Praćene su promjene u upalnim biljezima, adhezijskim molekulama i sublingvalnoj mikrocirkulaciji prije i nakon dežurstva, no primijećen je jedino značajan porast plazmatskih razina TF-a. Znamo da TF igra ključne uloge u hemostazi te je glavni fiziološki inicijator koagulacije, a njegove povećane razine induciraju blago hiperkoagulabilno stanje (Matejovic i sur., 2011).

Rezultati naših mjerenja pokazali su da je vrijeme fibrinolize kod liječnika kraće navečer (M=120 min) nego ujutro prije (M=180 min) i nakon dvadesetčetirisatnog dežurstva (M=190 min). Produženo vrijeme fibrinolize (hipofibrinolizu) u jutarnjim satima možemo objasniti fiziološkim cirkadijarnim promjenama u aktivnosti fibrinolitičkog sustava. Naime, rezultati jedne studije na mladim, zdravim ispitanicima oba spola upućuju na smanjenu bazalnu sistemsku aktivaciju plazminogena u jutarnjim satima. Mjerenja u 8 ujutro i 8 navečer pokazala su smanjenje vrijednosti inhibitora fibrinolize PAI-1 tijekom dana, što je praćeno porastom plazmatske aktivnosti t-PA (Kapiotis i sur., 1997). Moguće je da dnevne varijacije u fibrinolitičkoj aktivnosti diktira upravo cirkadijarni ritam PAI-1, na koji ne utječu doba dana i budnost (Irokawa i sur., 1998).

Pored fiziološkog cirkadijarnog ritma, naši su rezultati pokazali blago povišenje vrijednosti fibrinolize ujutro nakon dvadesetčetirisatnog dežurstva u odnosu na jutro prije početka dežurstva. To znači da je potrebno više vremena za razgradnju ugruška, što bismo mogli povezati s doživljenim stresom na radnom mjestu. Ta se razlika, iako ne značajna, poklapa sa rezultatima studije koju su proveli von Diest i suradnici (van Diest, 2002). Oni su ispitali povezanost stanja nazvanog vitalna iscrpljenost s izraženijim dnevnim promjenama u hemostatskim parametrima. Kod ispitanika s životnom iscrpljenošću izmjerili su više razine t-PA antigena, PAI-1 i tPA-PAI antigena u 7 sati ujutro u odnosu na kontrolnu skupinu. Te se razine nisu puno mijenjale u 6 sati popodne u odnosu na kontrolu skupinu. Njihova koagulacijska mjerenja nisu pokazala značajnu razliku između pojedinaca sa životnom iscrpljenošću i kontrolne skupine, što se također poklapa s našim mjerenjima prema kojima nismo imali mjerljivu aktivaciju koagulacijskog sustava.

Nedostatak našeg istraživanja zasigurno je to što nismo imali kontrolnu skupinu koja bi se sastojala od liječnika na specijalističkom usavršavanju, iste dobne skupine, koji bi na dan uzorkovanja imali slobodan dan. To je bilo teško organizirati jer bi se vađenje krvi trebalo provesti van bolnice, idealno u domu ispitanika, i to u tri navrata. Pomoću kontrolne skupine mogli bismo zaključiti u kojoj mjeri su promjene fibrinolize uzrokovane stresom u dežurstvu, a u kojoj mjeri su posljedica fiziološkog cirkadijarnog ritma. Uz to bismo mogli zaključiti i o promjenama u vrijednostima ostalih mjerenih koagulacijskih parametara. Također, veći broj ispitanika omogućio bi jasnije razlikovanje promjena koagulacijskih parametara između muškaraca i žena.

U istraživanju smo promatrali utjecaj samo jednog dvadesetčetirisatnog dežurstva na koagulacijske parametre što očito nije dovoljno velik psihosocijalni stres za pokretanje većih

promjena u hemostazi. Stoga je trebalo odabrati pretrage na koje će se odraziti i vrlo male promjene u hemostazi, kao što su već spomenuti pretrombotski markeri u koje spadaju D-dimeri i fibrinopeptid A. Ostali koagulacijski parametri čije povišene vrijednosti ukazuju na mogući razvoj KVB su aktivnosti FVII i FVIII, vWF antigen, t-PA antigen, PAI-1 antigen i kompleks plazmin- α 2-antiplazmin. Slabljenje fibrinolitičke aktivnosti odražavaju niske razine antitrombina III potrošenog u antikoagulantnom procesu (von Känel i sur., 2001). Predlažemo i određivanje tkivnog faktora, čije smo značenje objasnili ranije u ovoj raspravi.

Čak i kada bismo utvrdili male promjene u hemostazi zbog jednog dvadesetčetirisaatnog dežurstva, to ne bi bilo klinički značajno jer je moguće da se odmorom nakon dežurstva ti parametri uravnoteže. Zbog toga bi ispitanike trebalo pratiti kroz duži vremenski period kako bi se ispitale kumulativne posljedice rada u dežurstvima na zdravlje liječnika. Tada bismo vidjeli postoje li promjene između mladih liječnika čiji je rad povremeno organiziran u dvadesetčetirisaatna dežurstva i kontrolne skupine liječnika koji ne dežuraju noću, kao što su primjerice liječnici obiteljske medicine.

Saznanja o utjecaju noćnog rada na razvoj kardiovaskularnih bolesti bitna su radi praćenja zdravlja radnika preko preventivnih pregleda. Preporučuje se da se zdravstveni pregledi radnika koji rade noću provode redovito svake 3 godine, uz mogućnost obavljanja i ranijeg pregleda prema indikaciji nadležnog specijalista medicine rada, liječnika opće medicine ili poslodavca. Uz zdravstveni pregled se preporučuje i pregled kod psihologa. 2013. godine stupio je na snagu Pravilnik o sadržaju, načinu i rokovima zdravstvenih pregleda noćnih radnika (http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_10_122_2613.html) koji utvrđuje sadržaj, način i rokove zdravstvenih pregleda noćnih radnika, određuje način utvrđivanja zdravstvene sposobnosti, rokove u kojima se mora ponoviti utvrđivanje zdravstvene sposobnosti te sadržaj i način izdavanja svjedodžbe o zdravstvenoj sposobnosti noćnog radnika (Ptičar, 2013).

U ovom smo se radu fokusirali isključivo na liječnike koji rade u bolnicama, jer za razliku od drugih zanimanja, uz manjak sna i poremećaj cirkadijarnog ritma, liječnici moraju donositi odluke koje izravno utječu na zdravlje, a možda i život njihovih pacijenata, a uz to su pod vremenskim pritiskom, što zbog hitnosti stanja, što zbog većeg broja pacijenata po jednom liječniku. No, ne smijemo zaboraviti i koliko zamorno može biti neprestano raditi s ljudima koji nisu uvijek suradljivi. Iako u ovom radu nismo dokazali veće promjene u koagulacijskim parametrima, smatramo da su potrebna dodatna istraživanja zbog vrlo stresnog posla koji liječnici obavljaju, kako bi se što više saznalo o njihovom riziku za razvoj

kardiovaskularnih i drugih bolesti. Ti bi rezultati mogli utjecati na eventualnu reorganizaciju rada u dežurstvima i uvođenje češćih preventivnih pregleda te određivanja korisnijih biokemijskih pokazatelja promjena uzrokovanih stresom, a sve to s ciljem prevencije razvoja KVB u populaciji liječnika.

5. ZAKLJUČCI

1. Nisu dokazane statistički značajne promjene u vrijednostima PV-a, APTV-a, TV-a i koncentracije fibrinogena tijekom i nakon dvadesetčetirisaatnog dežurstva u odnosu na vrijednosti prije dežurstva.
2. Navedene globalne pretrage i koncentracija fibrinogena nisu dovoljno osjetljive na eventualne male promjene u koagulacijskom sustavu.
3. Zaključujemo da kod ispitanika nije došlo do značajne aktivacije koagulacijskog sustava zbog dvadesetčetirisaatnog dežurstva.
4. Utvrđena je statistički značajna promjena u vrijednostima fibrinolize tijekom i nakon dvadesetčetirisaatnog dežurstva.
5. Iz dobivenih rezultata nije jasno u kojoj je mjeri promjena u vrijednostima fibrinolize uzrokovana stresom doživljenim na dežurstvu, a u kojoj mjeri zbog fiziološkog cirkadijarnog ritma fibrinolize zbog nedostatka kontrolne skupine.

6. LITERATURA

- Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) – omjer, <http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=226>, pristupljeno: 20.4.2017.
- Bates SM, Weitz JI. Coagulation Assays. *Circulation*, 2005, 112, 53–60.
- Bonar R, Favaloro EJ, Adcock DM. Quality in coagulation and haemostasis testing. *Biochem Medica*, 2010, 20, 154–159.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. U: Hemostasis. St. Louis, Missouri, Elsevier, 2012, 2083-2125.
- Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*, 2015, 29, 17–24.
- Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 2009, 16, 300–317.
- Fibrinogen, <http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=752>, pristupljeno: 20.4.2017.
- Fibrinoliza - euglobulinski test, <http://klinkemija.kbcm.hr/test.php?recordID=58>, pristupljeno: 20.4.2017.
- Gu H, Tang C, Yang Y. Psychological stress, immune response, and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2012, 223, 69–77.
- Havelka M. Zdravstvena psihologija. Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 1995, 59-77.
- Irokawa M, Nishinaga M, Funayama H, Ikeda U, Shimada K. Effect of a change in the sleep/wake cycle on the diurnal variation of fibrinolytic parameters. *J Thromb Thrombolysis*, 1998, 5, 165–168.
- Kapiotis S, Jilma B, Quehenberger P, Ruzicka K, Handler S, Speiser W. Morning Hypercoagulability and Hypofibrinolysis. *Circulation*, 1997, 96, 19-21.
- Knežević B, Golubić R, Milošević M, Matec L, Mustajbegović J. Zdravstveni djelatnici u bolnicama i stres na radu: Istraživanje u zagrebu. *Sigurnost*, 2009, 51, 85–92.
- Kralj V. Kardiovaskularne bolesti, 2011, <http://www.hcjz.hr/index.php/hcjz/article/view/288>, pristupljeno 31.6.2017.
- Labar B. Hematologija. Školska knjiga, Zagreb, 2007, 406-412.
- Lazzarino AI, Hamer M, Gaze D, Collinson P, Steptoe A. The association between cortisol response to mental stress and high-sensitivity cardiac troponin T plasma concentration in healthy adults. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62, 1694–1701.

- Lee DY, Kim E, Choi MH. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep*, 2015, 48, 209–216.
- Lutze G, Breyer J, Zawta B, Useful Facts about Coagulation, Mannheim, Roche Diagnostics, 2000, 17.
- Mariotti A. The effects of chronic stress on health: new insights into the molecular mechanisms of brain – body communication. *Futur Sci*, 2015.
- Matejovic M, Chvojka J, Sykora R, Krouzecky A, Radej J, Parizkova R, Dostal P, Novak I, Cerny V. A 24-h work shift in intensive care personnel: biological pathways between work stress and ill health. *J Int Med Res*, 2011, 39, 629–636.
- McVicar A, Ravalier JM, Greenwood C. Biology of stress revisited: Intracellular mechanisms and the conceptualization of stress. *Stress Heal*, 2014, 30, 272–279.
- Nater UM, Skoluda N, Strahler J. Biomarkers of stress in behavioural medicine. *Curr Opin Psychiatry*, 2013, 26, 440–445.
- Pravilnik o sadržaju, načinu i rokovima zdravstvenih pregleda noćnih radnika, 2013, Zagreb, Narodne novine, broj 122 (NN/122/2013)
- Ptičar M. Noćni radnik i utjecaj noćnog rada na zdravlje radnika. *Sigurnost*, 2013, 55, 393–395.
- Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones *Indian J Endocrinol Metab*, 2011, 15, 18–22.
- Romani M, Ashkar K. Burnout among physicians. *Libyan J Med*, 2014, 9, 23556.
- Santhi N, Lazar AS, McCabe PJ, Lo JC, Groeger JA, Dijk D-J. Sex differences in the circadian regulation of sleep and waking cognition in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 25.
- Strapajević D. Procjena utjecaja rada u integriranoj bolničkoj hitnoj službi na zdravlje i radnu sposobnost djelatnika. *SG/NJ*, 2015, 20, 231–239.
- Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. Frankfurt/Main, TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998, 548.
- Tür FÇ, Toker İ, Şaşmaz CT, Hacı S, Türe B. Occupational stress experienced by residents and faculty physicians on night shifts. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2016, 24, 34.
- Vale S. Psychosocial stress and cardiovascular diseases. *Postgrad Med J*, 2005, 81, 429–435.
- van Diest R. Diurnal Variations in Coagulation and Fibrinolysis in Vital Exhaustion. *Psychosom Med*, 2002, 64, 787–792.
- Varjačić T, Braš M, Brajković L, Domokuš NA, Đorđević V. Stres i posljedice stresa liječnika onkologa. *Soc Psihijatr*, 2013, 41, 118–122.

Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, 2013, 93, 327–358.

von Känel R, Mills PJ, Fainman C, Dimsdale JE. Effects of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: a biobehavioral pathway to coronary artery disease? *Psychosom Med*, 2001, 63, 531–544.

von Känel RM. Acute mental stress and hemostasis: when physiology becomes vascular harm. *Thromb Res*, 2015, 135(1), 52-55.

Vrijkotte TGM, van Doornen LJP, de Geus EJC. Work Stress and Metabolic and Hemostatic Risk Factors *Psychosom Med*, 1999, 61, 796–805.

7. SAŽETAK / SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Dvadesetčetirisatna dežurstva predstavljaju jedan od većih stresora za liječnike jer osim umora i poremećaja cirkadijarnog ritma uključuju odgovornost u donošenju odluka i rad s pacijentima koji nisu uvijek suradljivi. Poznato je da stres na radnom mjestu dovodi do aktivacije koagulacijskog sustava, a nastalo hiperkoagulabilno stanje pogoduje razvoju kardiovaskularnih oštećenja.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dvadesetčetirisatnog dežurstva na globalne koagulacijske pretrage: PV, APTV i TV te na koncentraciju fibrinogena i vrijeme fibrinolize. U istraživanju je sudjelovalo 29 liječnika na specijalističkom usavršavanju. Liječnicima je krv uzeta tri puta: prije, tijekom i nakon dežurstva. Rezultati su pokazali da nije došlo do značajne aktivacije koagulacijskog sustava koja bi se odrazila na globalne pretrage i koncentraciju fibrinogena. Međutim, pokazalo se da je vrijeme fibrinolize dobiveno euglobulinskim testom produženo u dva jutarnja mjerenja u odnosu na mjerenje tijekom dežurstva u večernjim satima. Nije jasno u kojoj je mjeri navedena promjena uzrokovana stresnim dežurstvom, a u kojoj fiziološkim oscilacijama u aktivaciji fibrinolize.

7.2. SUMMARY

24-h work shifts are known to be one of the major stressors for physicians because of the circadian rhythm disruption and tiredness. Besides that, they include responsibility in making decisions and working with patients who are not always cooperative. Studies have shown that work stress leads to the activation of the coagulation system, and that the resulting hypercoagulable state favors the development of cardiovascular damage.

The aim of this study was to examine the effects of a 24-h work shift on global coagulation parameters: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and thrombin time (TT), but also the fibrinogen concentration and fibrinolysis time. The study group included 29 physicians on education. The blood was sampled three times: before, during and after the work shift. Our results have shown that there was no coagulation system activation that would affect global tests and fibrinogen concentration. However, fibrinolysis time obtained with the euglobulin test was extended in two morning measurements compared to the evening measurement. It is not clear if this is caused by work stress or the physiologic oscillations in fibrinolysis.

8. PRILOZI

8.1. POPIS KRATICA

ACTH -adrenokortikotropni hormon

APTV -aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme

CRH -kortikotropin-otpuštajući hormon

F –faktor zgrušavanja

IL -interleukin

KVB -kardiovaskularne bolesti

PAI-1 -inhibitor tkivnog aktivatora plazminogena

PV -protrombinsko vrijeme

TNF- α - faktora tumorske nekroze alfa

t-PA -tkivni aktivator plazminogena

TV -trombinsko vrijeme

u-PA -urokinaza

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

POVEZANOST STRESA I AKTIVACIJE KOAGULACIJSKOG SUSTAVA

Marta Kmet

SAŽETAK

Dvadesetčetirisatna dežurstva predstavljaju jedan od većih stresora za liječnike jer osim umora i poremećaja cirkadijarnog ritma uključuju odgovornost u donošenju odluka i rad s pacijentima koji nisu uvijek suradljivi. Poznato je da stres na radnom mjestu dovodi do aktivacije koagulacijskog sustava, a nastalo hiperkoagulabilno stanje pogoduje razvoju kardiovaskularnih oštećenja.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dvadesetčetirisatnog dežurstva na globalne koagulacijske pretrage: PV, APTV i TV te na koncentraciju fibrinogena i vrijeme fibrinolize. U istraživanju je sudjelovalo 29 liječnika na specijalističkom usavršavanju. Liječnicima je krv uzeta tri puta: prije, tijekom i nakon dežurstva. Rezultati su pokazali da nije došlo do značajne aktivacije koagulacijskog sustava koja bi se odrazila na globalne pretrage i koncentraciju fibrinogena. Međutim, pokazalo se da je vrijeme fibrinolize dobiveno euglobulinskim testom produženo u dva jutarnja mjerenja u odnosu na mjerenje tijekom dežurstva u večernjim satima. Nije jasno u kojoj je mjeri navedena promjena uzrokovana stresnim dežurstvom, a u kojoj fiziološkim oscilacijama u aktivaciji fibrinolize.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 37 stranica, 9 grafičkih prikaza, 3 tablice i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Stres na poslu, smjenski rad, hiperkoagulabilnost, fibrinoliza, koagulacijske pretrage

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Marija Grdić Rajković, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

RELATIONSHIP BETWEEN STRESS AND ACTIVATION OF THE COAGULATION SYSTEM

Marta Kmet

SUMMARY

24-h work shifts are known to be one of the major stressors for physicians because of the circadian rhythm disruption and tiredness. Besides that, they include responsibility in making decisions and working with patients who are not always cooperative. Studies have shown that work stress leads to the activation of the coagulation system, and that the resulting hypercoagulable state favors the development of cardiovascular damage.

The aim of this study was to examine the effects of a 24-h work shift on global coagulation parameters: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT) and thrombin time (TT), but also the fibrinogen concentration and fibrinolysis time. The study group included 29 physicians on education. The blood was sampled three times: before, during and after the work shift. Our results have shown that there was no coagulation system activation that would affect global tests and fibrinogen concentration. However, fibrinolysis time obtained with the euglobulin test was extended in two morning measurements compared to the evening measurement. It is not clear if this is caused by work stress or the physiologic oscillations in fibrinolysis.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 37 pages, 9 figures, 3 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Work stress, shift work, hypercoagulability, fibrinolysis, coagulation tests

Mentor: **Nada Vrkić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Grdić Rajković, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017.